

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-340080

(P2001-340080A)

(43)公開日 平成13年12月11日 (2001.12.11)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
C 1 2 N 15/09  
A 6 1 K 45/00  
A 6 1 P 3/10  
C 1 2 Q 1/02  
1/68

識別記号

F I  
A 6 1 K 45/00  
A 6 1 P 3/10  
C 1 2 Q 1/02  
1/68  
G 0 1 N 33/15

テマコード<sup>8</sup>(参考)

A

Z

審査請求 未請求 請求項の数14 OL (全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-103391(P2001-103391)  
(22)出願日 平成13年4月2日(2001.4.2)  
(31)優先権主張番号 特願2000-97365(P2000-97365)  
(32)優先日 平成12年3月31日(2000.3.31)  
(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 593067000  
岡 芳知  
東京都世田谷区代沢1丁目13番9号  
(72)発明者 岡 芳知  
東京都世田谷区代沢1丁目13番9号  
(74)代理人 100062144  
弁理士 青山 葵 (外1名)

(54)【発明の名称】 糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫惹起作用を有しないインスリン抵抗性改善薬の検索システム

(57)【要約】

【課題】糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫惹起作用を有しないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法、およびそれにより得られるインスリン抵抗性改善薬に関する。

【解決手段】プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子にレポーター遺伝子を結合させた組換え遺伝子を哺乳動物細胞に導入し、この細胞のレポーター遺伝子発現によりヒト血管内皮増殖因子遺伝子の発現を検出することにより糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫惹起作用を有しないインスリン抵抗性改善薬を得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子にレポーター遺伝子を結合させた組換え遺伝子を哺乳動物細胞に導入し、この細胞のレポーター遺伝子の発現によりヒト血管内皮増殖因子遺伝子の発現を検出することを特徴とする、糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫惹起作用を有しないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法。

【請求項2】レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項1記載のスクリーニング法。

【請求項3】プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子にレポーター遺伝子を結合させた組換え遺伝子。

【請求項4】インスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法に用いるための請求項3記載の組換え遺伝子。

【請求項5】レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項3記載の組換え遺伝子。

【請求項6】インスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法に用いるための請求項5記載の組換え遺伝子。

【請求項7】請求項1または2に記載のスクリーニング法を用いることにより得られるインスリン抵抗性改善薬。

【請求項8】プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子を、ベクターに組み込まれたレポーター遺伝子の上流にクローニングして得られる発現ベクターを哺乳動物細胞に導入し、この細胞のレポーター遺伝子の発現によりヒト血管内皮増殖因子遺伝子の発現を検出することを特徴とする、糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫惹起作用を有しないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法。

【請求項9】レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項8記載のスクリーニング法。

【請求項10】プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子を、ベクターに組み込まれたレポーター遺伝子の上流にクローニングして得られる発現ベクター。

【請求項11】インスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法に用いるための請求項10記載の発現ベクター。

【請求項12】レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項10記載の発現ベクター。

【請求項13】インスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法に用いるための請求項12記載の発現ベクター。

【請求項14】請求項8または9に記載のスクリーニング法を用いることにより得られるインスリン抵抗性改善薬。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】糖尿病、特に2型糖尿病は、臍 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌低下とインスリン感受性の低下、すなわちインスリン抵抗性を特徴とする。生活習慣の欧米化に伴うインスリン抵抗性の増加は、現在、糖尿病が急増している最大の原因となっている。インスリン抵抗性改

善剤には、日本ならびに海外で臨床使用されているピオグリタゾン（アクトス（登録商標））、海外で臨床使用されているロシグリタゾン（BRL-49653）、日本ならびに海外で臨床使用されていたが重篤な肝障害を生じる副作用のために2000年3月に販売が停止されたトログリタゾン（ノスカール（登録商標））、ならびに開発中のMCC-555、KRL-49653、およびKRP297などがあり、これらはいずれもチアゾリジン系の化合物である。また、非チアゾリジン骨格を有するものとしてJTT-501およびYM440が開発中であり、その他に、ビグアナイド系薬剤と総称されるインスリン抵抗性改善薬として臨床使用されている塩酸メトフォルミン（グリコラン、メルビン（登録商標））、塩酸ブフォルミン（ジベトスB（登録商標））がある。

【0002】すでに市販されているチアゾリジン誘導体系薬剤は浮腫（惹起作用）という副作用を有する。本発明者はこの副作用はチアゾリジン誘導体が、それを投与した患者において、強力な血管透過性亢進因子でもある血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）の血中濃度を増加させるためであること、さらに、これが血管内皮増殖因子をコードする遺伝子の発現を増加させるためであると見いだした。また、VEGFは糖尿病網膜症の発症・増悪の主要な因子であることが示されている（Aiello L.P.ら、N. Engl. J. Med. 331:1480-1487, 1994; Tanaka Y.ら、Lancet 349:1520, 1997; Adamis A.P.ら、Am. J. Ophthalmol. 118:445-450, 1994; Miller J.W.ら、Am. J. Pathol. 145:574-584, 1994; およびTolentino M.J.ら、Ophthalmology 103:1820-1828, 1996参照）。

【0003】チアゾリジン誘導体系薬剤が臨床使用されてまだ数年しか経っておらず、糖尿病網膜症の経過が比較的長いことから、該薬剤投与による糖尿病網膜症の悪化に関する報告はまだなされていないが、VEGFが糖尿病網膜症を増悪させる主要な因子であり、その血中濃度がチアゾリジン誘導体系薬剤の投与により増加すること、さらに、糖尿病網膜症では症状の1つとして網膜に浮腫がみられることが知られており（後藤ら編、最新医学大事典、第2版（1996）、医歯薬出版、1213頁「糖尿病性網膜症」の項参照）、チアゾリジン誘導体系薬剤の副作用である浮腫自体も糖尿病網膜症悪化の一因となり得ることからも、チアゾリジン誘導体系薬剤投与による糖尿病網膜症の悪化は当然予期されることである。

【0004】したがって、血中VEGFレベルの増加を引き起こさないインスリン抵抗性改善薬は糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫という副作用を生じない優れた薬剤となることが期待される。そこで、本発明者は、VEGF遺伝子発現を検出できる組換え遺伝子系を作製し、この組換え遺伝子系を導入した細胞を用いれ

ば、糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫という副作用を生じない優れたインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングすることができることを見いだし、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子にレポーター遺伝子を結合させた組換え遺伝子を哺乳動物細胞に導入し、この細胞のレポーター遺伝子発現によりヒト血管内皮増殖因子遺伝子の発現を検出することを特徴とする、糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫惹起作用を有しないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法を提供するものである。さらに本発明は、プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子にレポーター遺伝子を結合させた組換え遺伝子を提供するものである。本発明の別の目的は、プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子を、ベクターに組み込まれたレポーター遺伝子の上流にクローニングして得られる発現ベクターを哺乳動物細胞に導入し、この細胞のレポーター遺伝子の発現によりヒト血管内皮増殖因子遺伝子の発現を検出することを特徴とする、糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫惹起作用を有しないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法を提供することである。本発明のさらに別の目的は、プロモーター領域を含むヒト血管内皮増殖因子遺伝子を、ベクターに組み込まれたレポーター遺伝子の上流にクローニングして得られる発現ベクターを提供することである。本発明はまた、上記スクリーニング法を用いることにより得られるインスリン抵抗性改善薬をも提供するものである。本発明のスクリーニング法は、チアゾリジン系のみならずあらゆる種類のインスリン抵抗性改善薬の開発に広く応用可能であり、より安全なインスリン抵抗性改善薬を開発するためにはむしろぜひ応用すべきものである。本明細書において「レポーター遺伝子」は、本発明の目的に使用可能あらゆるレポーター遺伝子を意味し、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子およびクロラムフェニコールアセチルトランスクレーヴ（CAT）遺伝子などが含まれるがこれらに限定されるものではない。これらレポーター遺伝子は一般に市販されているものを使用することができる。好ましいレポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子である。以下の試験例および実施例において、本発明をさらに詳細に説明するが、これらは単に例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

#### 【0006】試験例1

本発明者は、薬剤投与で認められる浮腫の臨床像が、血管透過性亢進でよく説明できることに着目し、チアゾリジン系薬剤であるトログリタゾン投与糖尿病患者において、強力な血管透過性亢進因子であるVEGF（別名vascular permeability factor）の血清値を測定したところ、その平均値は120.1 pg/mL (n=30) であり、食事療法群 (29.2 pg/mL, n=1

0)、スルホニル尿素剤投与 (SU) 群 (25.8 pg/mL, n=10)、インスリン療法群 (24.6 pg/mL, n=10) と比較して有意 ( $p < 0.001$ ) に増加していた。5人の患者で投与前より経過を追ったところ、投与により上昇し、投与中止により前値に復した。さらに、3T3-L1脂肪細胞中のVEGFRNAの発現は患者血中濃度に等しい濃度の、トログリタゾン添加および同様の作用機構を有するロシグリダゾン添加で増加した。

#### 【0007】実施例1

##### (1) ヒトVEGF遺伝子プロモーターの単離

既報のマウスVEGF mRNAの塩基配列 (Claffey KPら、J. Biol. Chem. 267: 16317-16322, 1992; GenBank accession no. M95200) をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、次いでRT-PCR法により3T3-L1脂肪細胞RNAよりマウスVEGFcDNA断片を得た。このcDNAをプローブとしてヒトゲノムDNAライブラリー (ストラタジーン社) をスクリーニングし、ヒトVEGF遺伝子（その上流約9 kb および下流約3 kb を含む）を単離した。

#### 【0008】(2) トログリタゾン応答領域を含むヒトVEGF遺伝子プロモーター／ルシフェラーゼレポータープラスミドの作成

上記(1)で単離したクローンから、ヒトVEGF遺伝子の転写開始点より上流約2.2 kb を含むDNA断片 (-2274~+50, KpnI-NheI) を得た。このDNA断片をpGL3ベクター(プロメガ社)のルシフェラーゼ遺伝子の上流にクローニングし、VEGF遺伝子プロモーター／ルシフェラーゼを作成した。該レポータープラスミドpVEGF2.2LUCは、Escherichia coli JM109/phVEGF2.2LUCとして産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された（受託番号：FERM P-18281、受託日：平成13年3月30日）。pVEGF2.2LUCを $\beta$ ガラクトシダーゼの発現プラスミドpCMV- $\beta$ （クロントック社）とともにA-172細胞 (JCRB0228, JCRB Cell Bank) にリポフェクション (lipofection) 法を用いて導入した。導入6~8時間後にトログリタゾン (20 $\mu$ M) 添加、または非添加培養液に移し、さらに24時間培養後、細胞を生理的食塩水で洗浄し、細胞溶解用緩衝液（プロメガ社）に溶解し、上清のルシフェラーゼ活性及び $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、pVEGF2.2LUCを導入した細胞で、トログリタゾン添加によるルシフェラーゼ／ $\beta$ ガラクトシダーゼ活性比の増加がみられ、pVEGF2.2LUCがトログリタゾン応答領域を含むVEGF遺伝子プロモーター／ルシフェラーゼレポータープラスミドであることが確認された。図1に得られたpVEGF2.2LUCの遺伝子マップを示す。

【0009】(3) 被検薬剤によるヒトVEGF遺伝子転写活性化のスクリーニング

上記(2)で得られたプラスミドが、広くインスリン抵抗性改善薬のVEGF遺伝子転写活性化能のスクリーニング

に利用できることを確認するため以下の実験を行なった。A-172細胞に上記(2)で作成したレポータープラスミドphVEGF2.2LUCおよび $\beta$ ガラクトシダーゼ発現プラスミドpCMV- $\beta$ をリポフェクション法を用いて導入した(以降、本明細書ではここで得られた細胞をA-172VEGF細胞という)。レポータープラスミドおよび $\beta$ ガラクトシダーゼ発現プラスミド導入6~8時間後に被検薬剤(ピオグリタゾン20 $\mu$ M)またはトログリタゾン(20 $\mu$ M)を含む培養液に移し、さらに24時間後に細胞を生理的食塩水で洗浄し、次いで細胞溶解用緩衝液に溶解した。細胞溶解液を遠心処理(12,000 g × 10秒)して得られた上清のルシフェラーゼ及び $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を測定し、ルシフェラーゼ/ $\beta$ ガラクトシダーゼ活性比を算出した。結果を図2に示す。図2に示した結果から明らかなように、トログリタゾンには強いVEGF遺伝子転写活性化能が見られ、一方、ピオグリタゾンのVEGF遺伝子転写活性化能はコントロールよりやや強いがトログリタゾンより弱かった。すなわち、この2剤を糖尿病網膜症を増悪させる可能性および浮腫惹起作用が低いという観点から比較すると、ピオグリタゾンのほうがトログリタゾンより優れていることがわかった。以上の結果から、本発明のスクリーニング法を用いて候補化合物をスクリーニングすることにより、VEGF遺伝子転写活性化能がより低い、さらには、患者に投与した際に糖尿病網膜症を増悪させる可能性がなく、浮腫惹起作用を有しない

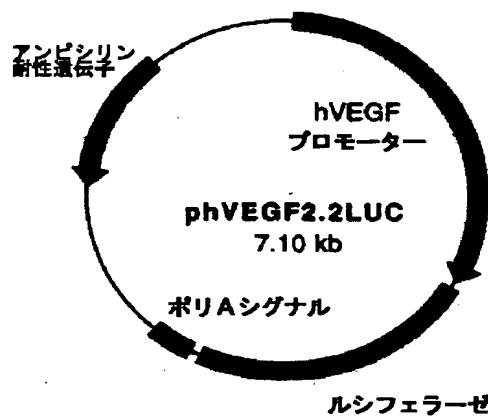
インスリン抵抗性改善薬を得ることができるだけでなく、既存のインスリン抵抗性改善薬の上記副作用を予測するのにも応用可能であることが明らかになった。

【図面の簡単な説明】

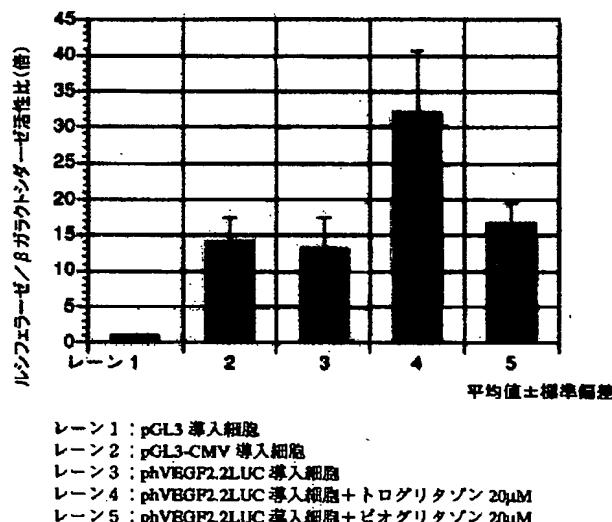
【図1】 トログリタゾン応答領域を含むVEGF遺伝子プロモーター/ルシフェラーゼレポータープラスミドphVEGF2.2LUCの遺伝子マップを示す。

【図2】 A-172VEGF細胞を用いた、チアゾリジン系インスリン抵抗性改善薬のVEGF遺伝子転写活性化能に関するスクリーニング実験の結果を示すグラフである。トログリタゾン存在下で培養したA-172VEGF細胞(レーン4)では、トログリタゾン非存在下で培養したA-172VEGF細胞(コントロール、レーン3)に比べて、その上清でのルシフェラーゼ/ $\beta$ ガラクトシダーゼ活性比が著しく増大する。一方、ピオグリタゾン存在下で培養したA-172VEGF細胞(レーン5)ではルシフェラーゼ/ $\beta$ ガラクトシダーゼ活性比の増大はコントロールよりやや高いが、トログリタゾン存在下より弱かった。pGL3(プロメガ社)だけを導入したA-172細胞(レーン1)およびCMVプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置したpGL3-CMVを導入したA-172細胞(レーン2)の上清でのルシフェラーゼ/ $\beta$ ガラクトシダーゼ活性比を、この細胞でのVEGFプロモーターの基礎活性を示すためのコントロールとして同時に示した。

【図1】



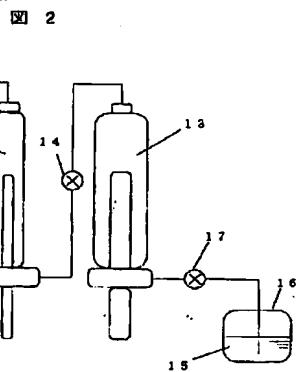
【図2】



フロントページの続き

(51) Int.C1. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークコード(参考)	
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/50	Z
	33/50		33/68	
	33/68	C 1 2 N	15/00	A

2002-274294/32 HITACHI SCI SYSTEMS KK 2000.05.30 2000-164730(+2000JP-164730) (2001.12.07) G01N 35/10, B01D 12/00, B01J 4/00, B08B 3/04, 9/027 Biological sample dispensing apparatus e.g. for blood, urine, has washing syringe which absorbs cleaning liquid to wash serially connected dispensing syringe, after discharging test sample C2002-081258 Addnl. Data: HITACHI LTD (HITA )	HITA- 2000.05.30 *JP 2001337094-A The amount of encroachment to test substance sample is controlled by using liquid level detection rod. Since a washing syringe is serially connected to dispensing syringe, dispensing syringe is cleaned efficiently in short time.
<b>NOVELTY</b> A dispensing syringe (12) serially connected to washing syringe (13), absorbs specified amount of test sample (4) using a liquid level detection rod (7). A SG meter measures the specific gravity and turbidity of the sample. After discharging the sample, the washing syringe absorbs large amount of cleaning liquid to clean the dispensing syringe. <b>USE</b> For dispensing biological samples such as blood, urine, in clinical laboratory test autoanalysis apparatus. <b>ADVANTAGE</b>	<b>DESCRIPTION OF DRAWING</b> The figure shows the flow path composition schematic view of dispensing apparatus. Test sample 4 Liquid level detection rod 7 Dispensing syringe 12 Washing syringe 13



(Spp3139DwgNo.2/5)

JP 2001337094-A+

JP 2001337094-A

2002-274442/32 OKAY 2000.03.31 2000-097365(+2000JP-097365) (2001.12.11) C12N 15/09, A61K 45/00, C12Q 1/02, G01N 33/15, 33/68, 33/50, C12Q 1/68, A61P 3/10 Screening drug improving insulin resistance without exacerbating diabetic retinopathy, by detecting expression of reporter gene fused to promoter region of human vascular endothelial growth factor gene, in mammal cell C2002-081277 Addnl. Data: 2001.04.02 2001JP-103391	OKAY/ 2000.03.31 *JP 2001340080-A B(4-E1, 4-E8, 4-E12, 11-C8E, 12-K4E) D(5-H9, 5- H12A, 5-H12E) .5	B0151
<b>NOVELTY</b> Screening (M1) a drug which improves insulin resistance without exacerbating diabetic retinopathy and inducing edema, involves use of recombinant gene comprising reporter gene (I) coupled to promoter region of human vascular endothelial growth factor (VEGF) gene. (I) is introduced into a mammal cell, and expression of VEGF gene is detected by expression of reporter gene in the cell. <b>DETAILED DESCRIPTION</b> (M1) involves use of recombinant gene comprising reporter gene (I) coupled to human vascular endothelial growth factor (VEGF) gene	promoter region. (I) is introduced into a mammalian cell, and expression of VEGF gene is detected by expression of reporter gene in cell. Optionally, the method involves introducing an expression vector comprising a cloned promoter region of human VEGF gene fused to a reporter gene, into the mammalian cell; and detecting expression of the human VEGF gene by detecting expression of the reporter gene. INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following: (1) a recombinant gene (I) comprising a reporter gene coupled to a promoter region of human vascular endothelial growth factor (VEGF) gene; (2) a drug which improves insulin resistance identified by the above mentioned method; and (3) An expression vector (II) comprising cloned promoter region of human VEGF gene, fused to a reporter gene. <b>USE</b> For screening a drug which improves insulin resistance without exacerbating diabetic retinopathy and inducing edema. (I) and (II) are useful in the screening method of an insulin resistance improvement	JP 2001340080-A+

BEST AVAILABLE COPY

drug.

#### ADVANTAGE

A drug which improves insulin resistance without exacerbating diabetic retinopathy, and inducing edema is obtained by the novel method.

#### EXAMPLE

An oligonucleotide primer was prepared on the basis of the known base sequence (Claffey KP et al., J. Biol. Chem. 267:16317-16322, 1992) of mouse vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA. Subsequently mouse VEGF cDNA fragment was obtained from 3T3-L1 fat cell RNA by RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) process which was used as a probe to screen a human genome DNA library. A human VEGF gene (containing 9kb upstream and downstream 3kb) was isolated. The DNA fragment (02274 to +50, KpnI-NheI) which contained upstream 2.2kb from the transcription start site of a human VEGF gene was obtained from the clone. This DNA fragment was cloned upstream of the luciferase gene of pGL3 vector to obtain a VEGF gene promoter/luciferase construct, phVEGF.2LUC. Along with expression plasmid pCMV- $\beta$ , galactosidase, phVEGF.2LUC was introduced into A-172 cell (JCR-

B0228, JCR cell bank) by lipofection. Troglitazone (20 micro M) was added after 6-8 hours. The cells were washed with physiological saline solution after cultivating for 24 hours and added with buffer. The luciferase activity and  $\beta$  galactosidase activity of supernatant liquid was measured and an increase in the luciferase/ $\beta$  galactosidase activity ratio after troglitazone addition was observed. Thus VEGF gene promoter/luciferase reporter plasmid phVEGF.2LUC contained a troglitazone response region. The reporter plasmid was then used for the screening of VEGF gene transcriptional activation ability of an insulin resistance improvement drug. Reporter plasmid phVEGF.2LUC, and  $\beta$  galactosidase expression plasmid pCMV- $\beta$  were introduced into A-172 cell by lipofection to obtain A-172 VEGF cell. After 6-8 hours, the cells were introduced into culture solution which contained a tested chemical agent (pioglitazone 20 micro M) or tested troglitazone (20 micro M). After 24 hours, the cells were washed with physiological saline and then added with dissolving buffer. The luciferase and beta galactosidase activity of supernatant liquid obtained by carrying out centrifugation of cell solution was measured. Troglitazone had a strong VEGF gene transcriptional activation ability. Although VEGF gene transcriptional activation ability of a pioglitazone was a little stronger than control, it was

JP 2001340080-A/1

2002-274442/32

B0152

weaker than troglitazone. Thus pioglitazone is superior to troglitazone, in improving insulin resistance, with low induction of edema and diabetic retinopathy.

#### TECHNOLOGY FOCUS

Biotechnology - Preferred Method: The reporter gene is preferably a luciferase gene, is coupled to the vector. (Spp3264DwgNo.0/2)

JP 2001340080-A/2

2002-274443/32 B04 C07 D16 E16 (D13

D25)

ASAHI 2000.06.01

\*JP 2001340096-A

ASAHI KASEI KOGYO KK  
2000.06.01 2000-164000(+2000JP-164000) (2001.12.11) C12P 13/04  
(C12P 13/04, C12R 1:38)

Manufacture of glycine useful as food additive, comprises acting *Pseudomonas* on aqueous glycinonitrile solution, in reaction conditions where there is no acid, alkali or buffer used to adjust the pH

C2002-081278

#### NOVELTY

Manufacture of glycine comprises acting *Pseudomonas* microorganisms on aqueous glycinonitrile solution, in reaction conditions there is no acid, alkali or buffer used to adjust the pH.

#### USE

The method is used for the microbiological manufacture of glycine useful as food additive, cleaner, and pharmaceuticals and agrochemicals synthetic raw material.

#### ADVANTAGE

The method enables efficient manufacture of glycine with high

B(10-B2B, 11-A1) C(10-B2B, 11-A1) D(3-H, 5-C1, 11-B) E(10-B2D6) .2 B0153

industrial value. The method enables quantitative and simultaneous formation of glycine and ammonia, with high activity/dry microbial cells/unit time, without any abundant discarding of microbial cells or culture medium. The method also does not add or discard acid, alkali or buffer for adjusting pH of the reaction solution. The method enables separate collection of glycine and ammonia, with high efficiency, and without performing any degradation process and consumption.

#### TECHNOLOGY FOCUS

Inorganic Chemistry - Preferred Reaction: The reaction conditions are exclusive reaction conditions, they isolate the separation of ammonia formed in the reaction solution from the reaction solution, by distillation under reduced pressure in presence of inert gas.

Biotechnology - Preferred Microorganism: The *Pseudomonas* is especially *Pseudomonas* sp. strain 88-SB-CNS (under FERM P procedure).

(6pp313DwgNo.0/0)

JP 2001340096-A

BEST AVAILABLE COPY